

How well does Turing's theory of morphogenesis work?

How well does Turing's theory of morphogenesis work?

三浦 岳

* 京都大学大学院医学研究科

生体構造医学講座 形態形成機構学教室

*Takashi Miura

** Department of Anatomy and Developmental Biology, Kyoto University Graduate School of Medicine
Yoshida Konoe-Chou, Sakyo-Ku, 6068501, JAPAN*

miura.takashi@mac.com

- Turing 不安定性では、ある程度以上の個数のパターンを一定領域上に作ろうとすると、個数にバラツキが生じるため、信頼性が低いという J. Bard の有名な仕事がある。(Bard & Lauder, 1974)。しかし、この論文で用いられているモデルの線形安定性解析をしてみると、パラメータが diffusion driven instability の範囲にないことがわかった。
- ランダムネットワークで Turing パターンを生成するネットワークモチーフが作られるかについては、Salazar-Ciudad らは作れると主張し、藤本らは生成できないと主張している。すべてのパラメータをランダムに選んだ場合に Turing instability がどの程度生成されやすいのか、2 変数の一番単純な場合についてモンテカルロ法で数値計算を行った。その結果から、Salazar-Ciudad らは「転写因子」として拡散係数 0 の因子を考慮しており、それによってパターンが生成されやすいことが示唆された。
- 李聖林らによって、遺伝子間相互作用に時間遅れの入った Turing 不安定性の特徴に関する仕事が近年なされている (Seirin Lee & Gaffney, 2010)。しかし、彼らは非線形のモデルでの数値計算を主に行い、数理解析はほとんどなされていない。我々は、標準化した線形の系で解析を行い、時間遅れを導入しても固有値の最大値の符号は変化しないことがわかった。また、GFP の蛍光強度の時間変化のデータから、「遺伝子発現だから時間遅れが入るはず」という仮定自体にも再考が必要と思われる。

1 Introduction

このタイトルを見て、古くからパターン形成に関わっている人はピンと来るかもしれない。これは、1974 年に Jonathan Bard が発表した論文のタイトルである (Bard & Lauder, 1974)。発生における自発的パターン形成の研究で、Turing パターンの研究は特別な地位を占めている (Kondo & Miura, 2010)。1952 年の論文 (Turing, 1952) 以来、様々な応用例が考えられてきたが、1995 年に近藤滋が魚の縞模様の経時変化で非常に確からしい実例を提示するまで、本当に生物の体の中でこの系が存在するのかは長いこと不明だった (Kondo, 1995)。その間、この系が生物では使われていないのではないか、という議論もよく行われてきた。この項では、そのような、Turing パターンが生物の体の中で本当に実装できるのかの議論に関して、例を挙げて解説する。

2 形成される構造の数の不確実性

Bard & Lauder (1974) のなかで著者らは、数値計算で Turing パターンを生成させ、領域あたりの構造の個数が多い場合、例えば 8 個の構造を確実に作ろう、というようなことをしようとすると、個数のばらつきが生じるので、このような用途には適していない、ということを論じた。この論文は非常に影響力があって、今でもよく引用される (2012 年 3 月現在で引用数 92)。しかし、この論文で引用されている図を見ると何かパターンが変である (Fig. 1A)。そこで、この論文で用いている系を精査してみた。まず、支配方程式は

$$\frac{\partial X_r}{\partial t} = \frac{S_p}{16}(16 - X_r Y_r) + \frac{1}{4}(X_{r+1} - 2X_r + X_{r-1}) \quad (1)$$

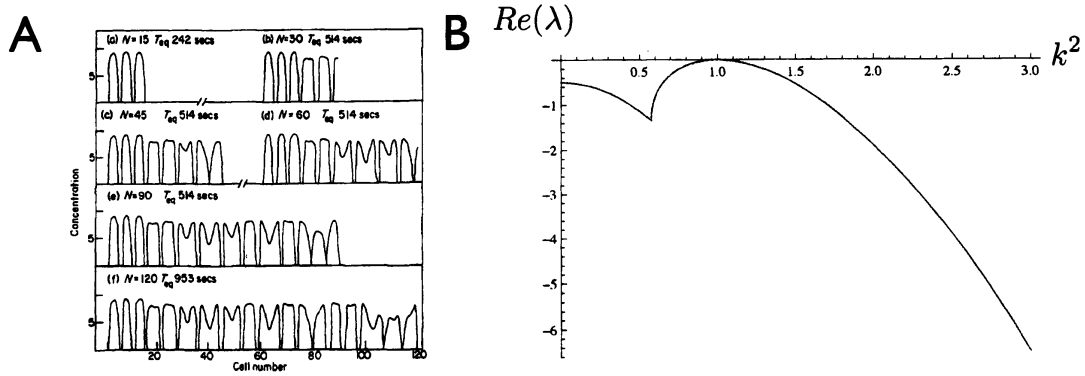


図 1: A. Bard & Lauder (1974) 内での数値計算結果。 B. 彼らが用いている系の線形分散関係。

$$\frac{\partial Y_r}{\partial t} = \frac{S_p}{16}(X_r Y_r - Y_r - \beta_r) + \frac{1}{16}(Y_{r+1} - 2Y_r + Y_{r-1}). \quad (2)$$

となっており、 β という見慣れない変数が入っている。これは、advocation factor という説明があり、ノイズが継続的に入る形になっている。この系の平衡点を探すと、 $X = Y = 4$ となっており、 $u = Y - 4$ 、 $v = X - 4$ として系を平衡点周りで線形化すると、

$$u' = 3u + 4v - uv + d_u \Delta u \quad (3)$$

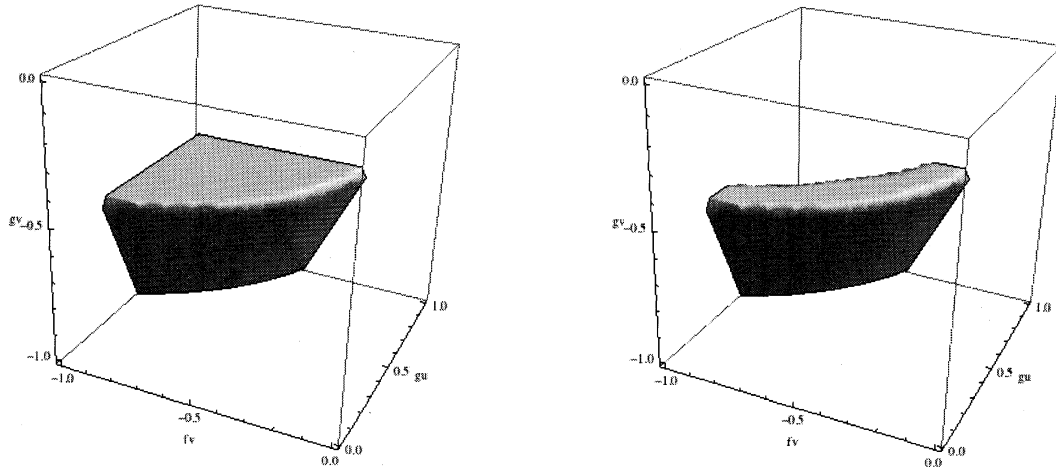
$$v' = -4u - 4v - uv + d_v \Delta v. \quad (4)$$

となる。このパラメータで線形分散関係を描いてみると、固有値の最大値が 0 であることがわかった (図 1 B)。つまり、この系では、特定の周波数成分が長く残る、ということは生じるが、拡散誘導不安定性は生じない。彼らが主張している数値計算結果は、多分外部から入れているノイズ成分 β に拡散項でスムージングをかけたようなものを見ているだけのようだ。

この論文の著者の Jonathan Bard は、私が留学していた Oxford 大学のラボの PI である Gillian Morriss-Kay と再婚して、Edinburgh 大学との間で毎週車で 5 時間かけて行き来していた。そのときにときどき数理生物学の黎明期のことを伺う機会があったのだが、もともと皮膚の縞模様に Turing パターンを使えるのではないかと最初に思いついたのは Jonathan だったらしい。しかし、Jonathan 自身は数値計算はできるものの全然数学ができない。そうこうしているうちにセミナーを聴いた James Murray が先に論文を発表してしまい、数理生物学の世界では Murray さんが先に応用例に気がついたことになってしまった。大変悔しがった Jonathan は、なんとか Turing パターンが実は生物の発生では使われていない、ということをおうとしていた。どうもこの論文もその流れにあるようだ。私は Oxford に滞在中、大振幅の Turing パターンの定常解を、反応項の非線形部分を区分線形近似して、特異摂動法で構成する、というようなことをしていた (Miura et al., 2006) が、その話をすると、"Turing パターンは私たちがやったときは振幅が小さすぎて実用に堪えなかった" というようなことを主張していて奇異な感じがした。これはどうやら、前述のように適切なパラメータセットを用いていなかったためらしい。

最初に生成されるパターンのばらつきに関しては、実は線形分散関係の不安定領域の中に、境界条件で規定される波数が入り込むことができるか、でかなり予測できる (Murray, 2003)。不安定か幅が広いと、初期値のホワイトノイズの中の各周波数成分の分布によっては、最適ではない波数が競争に勝って成長することがある、ということである。類似の問題として不安定領域の幅と二次元パターンの乱れの関係を昌子らが解析している (Shoji & Iwasa, 2005)。

3 ランダムネットワークで Turing 系は作れるか？



$$f_u = 0.5, d_u = 0.01$$

$$f_u = 0.5, d_u = 0.2$$

図 2: *Mathematica* の `RegionPlot3D` 関数による Turing space の可視化。6 つあるパラメータのうち d_v を固定し、 f_u と d_u を可変にしてある。

数理生物学の分野でよくある議論として、Turing 系を作ることのできるパラメータ領域は非常に狭いのではないか、というものがある。要は、恣意的にパラメータを選んでやらないと Turing パターンは作れないのではないか、という議論である。技術的な狭い意味での Turing パターンは、拡散が存在しないと安定だが拡散の効果があれば特定の波数が不安定化する、というもので、線形のパラメータの必要十分条件が既にわかっている。用いる Turing 系を

$$u' = f_u u + f_v v + d_u \Delta u \quad (5)$$

$$v' = g_u u + g_v v + d_v \Delta v \quad (6)$$

とすると、この系が Turing パターンを作る必要十分条件は

$$f_u + g_v < 0 \quad (7)$$

$$f_u g_v - f_v g_u > 0 \quad (8)$$

$$d_v f_u + d_u g_v > 0 \quad (9)$$

$$(f_u d_v + d_u g_v)^2 - 4 d_u d_v (f_u g_v - f_v g_u) > 0 \quad (10)$$

と書ける (Murray, 2003)。これは 4 つの不等式の組み合わせだが、線形のパラメータを適当に選んでこの条件が成り立つ確率はどのくらいなのだろうか？

解析的に解くのはしんどいので、各線形パラメータを乱数で割り当てて、そのパラメータの組が Turing パターンを生成する確率を算出してみた。すると、すべての方向が正しい状態でも、Turing パターンを生成する確率は 1% 程度だった。これはそれほど確率が高いとは言えない。しかし、この系で、activator の拡散係数が inhibitor の拡散係数よりも非常に小さい、と仮定すると、この確率は 25% 程度まで上昇する。

なぜ 25% か、というのは直感的に理解することができる。前述の 4 つの必要十分条件のうち、後半の二つは $d_u \ll d_v$ であれば自動的に成り立つ。従って、前半二つが成り立つ確率を求めれば良いが、最初の

つは2つの乱数のうちどちらが大きい、次は、二つの乱数の積はどちらが大きい、でどちらも1/2の確率で、しかも独立の事象なので、合わせて1/4になる。

このような、拡散係数が大きく異なる状況というのは本当に妥当なのか、という議論がある。Einstein-Stokes の式で考えると、拡散係数は分子量の三乗根に反比例するので、activator の分子量が inhibitor の分子量より 1000 倍ぐらい大きくないといけない。したがって、実効拡散を変化させるために、分子量以外の工夫が必要になる。例えば、人工的に Turing パターンを化学的に実装する際、De Kepper らはでんぷんのゲルの中でヨウ素を使って反応を起こした (Castets et al., 1990)。これによって、activator 役のヨウ素の拡散係数を大きく下げることが可能になった。生体内でもそのような現象が存在するかというと、実はある。細胞外の拡散性のシグナル因子の多くは、ヘパリン硫酸プロテオグリカン (HSPG) という細胞外基質に結合して動かなくなる (Häcker et al., 2005)。その結果、実効的な拡散係数が数桁違う、ということも割と頻繁に起こる。FRAP や FCS 等の手法が発達してきて、組織内での拡散ダイナミクスの実測ができるようになってきており (Yu et al., 2009)、これまでの理論モデルへの実験的な裏付けがここ数年で急速に進むことが予想される。

この話の応用として、周期構造を生成するネットワークの進化、という話がある (Salazar-Ciudad et al., 2001)。細胞外への拡散を含んだ遺伝子ネットワークを考え、そのなかでも周期構造を作るものは適応度が高い、ということにして、mutation をかけつつ進化させてやる。すると、まずは Turing パターンのような、少数の因子が相互作用によって構造を形成させるやり方が最初に出てくるが、それが次第に、個々の構造を個別の遺伝子が指定するような、Hox 遺伝子のようなやり方に置き換わっていく、というシナリオを提唱した。この説は、手の発生で実際に観測されているやり方に近いので、発表時にかなり話題になった。その後、大阪大学の藤本らがこの研究の追試をしているが、何をどうしても Turing パターンは出ない、という結論になってしまった (Fujimoto & Ishihara, 2008)。これはいったい何が違ったのだろうか？

両者のモデルのセッティングを比較してみると、Salazar-Ciudad はすべての因子を、全く拡散しない転写因子と、拡散性のシグナル因子の二群に分けて数値計算を行っている。それに対して、藤本は、すべての因子に、ある平均値と分散を持つ拡散係数を割り振っている。これによって、Salazar-Ciudad の系では、実行拡散係数が非常に異なる因子のペアが生じやすくなって、Turing 不安定性が生じやすかったと思われる。

4 遺伝子発現の時間遅れと Turing パターン

時間遅れ系は数理生物学の分野ではよく研究されている。最近になって、遺伝子発現には時間遅れが存在するはずであるから、既存の Turing 系に時間遅れを導入すると様々な「異常な (aberrant)」挙動が生じる、という報告がいくつかなされている (Seirin Lee & Gaffney, 2010; Seirin Lee et al., 2010, 2011)。しかし、これらの報告は数値計算が主で、数理解析はほとんどなされていない。このなかで、比較的単純な、パターン形成が起こるかどうか、のみにしぼって数理解析を試みよう。

まず、前述の (5) では、固有値の最大値、すなわちパターンの出現速度は以下のように書ける。

$$\lambda_{max} = \frac{d_v f_u - d_u g_v - 2\sqrt{-d_u d_v f_v g_u}}{d_v - d_u}, \quad (11)$$

この値は、どのパラメータに一番依存するだろうか？ f_u から g_v までの反応項のパラメータはほぼ同じオーダーとして、 $d_u = \epsilon d_v$ としたとき、各パラメータの sensitivity analysis をしてみる。

4.1 f_u

$$\frac{\partial \lambda_{max}}{\partial f_u} = \frac{d_v}{d_v - d_u} \approx 1. \quad (12)$$

4.2 f_v

$$\frac{\partial \lambda_{max}}{\partial f_v} = \frac{d_u d_v g_u}{(d_v - d_u) \sqrt{-d_u d_v f_v g_u}} \approx \epsilon. \quad (13)$$

4.3 g_u

$$\frac{\partial \lambda_{max}}{\partial g_u} = \frac{d_u d_v f_v}{(d_v - d_u) \sqrt{-d_u d_v f_v g_u}} \approx -\epsilon. \quad (14)$$

4.4 g_v

$$\frac{\partial \lambda_{max}}{\partial g_v} = \frac{-d_u}{d_v - d_u} \approx -\epsilon^2. \quad (15)$$

このことから、activator の positive feedback 項 (f_u) がパターンの出現には一番効くことがわかる。このことから、ポジティブフィードバック項に時間遅れの入った下の系について考える。

$$u' = f_u u(t - \tau) + f_v u(t) + d_u \Delta u \quad (16)$$

$$v' = g_u u + g_v v + d_v \Delta v. \quad (17)$$

ここで

$$\mathbf{A}_0 = \begin{pmatrix} 0 & f_v \\ g_u & g_v \end{pmatrix}, \mathbf{A}_1 = \begin{pmatrix} f_u & 0 \\ 0 & 0 \end{pmatrix}, \mathbf{D} = \begin{pmatrix} d_u & 0 \\ 0 & d_v \end{pmatrix}. \quad (18)$$

とすると、この系は

$$\mathbf{u}' = \mathbf{A}_0 \mathbf{u} + \mathbf{A}_1 \mathbf{u}(t - \tau) + \mathbf{D} \Delta \mathbf{u}. \quad (19)$$

という形で書くことができる。実はこの形は、通常通りの固有値解析ができて、

$$\mathbf{u} = e^{\lambda t} \sin(kx) \quad (20)$$

として、(20) を (19) に代入すると

$$\lambda \mathbf{u} = \mathbf{A}_0 \mathbf{u} + e^{-\lambda \tau} \mathbf{A}_1 \mathbf{u} - k^2 \mathbf{D} \mathbf{u}. \quad (21)$$

となる。行列式が 0 でないといけないので、

$$|\lambda \mathbf{I} - \mathbf{A}_0 - e^{-\lambda \tau} \mathbf{A}_1 + k^2 \mathbf{D}| = 0. \quad (22)$$

となる。これを k^2 について解くと

$$k^2 = \frac{e^{-\lambda \tau}}{2d_u d_v} (d_v f_u - e^{\lambda \tau} (d_u (\lambda - g_u) + \lambda d_v) \pm \sqrt{B}) \quad (23)$$

ここで

$$B = (d_v f_u - e^{\lambda \tau} (d_u (\lambda - g_v) + \lambda d_v))^2 - 4d_u d_v e^{\lambda \tau} (\lambda (\lambda - g_v) - f_v g_u) + f_u (g_v - \lambda) \quad (24)$$

である。 λ は $B = 0$ の時最大になるので、

$$\tau = -\frac{1}{\lambda_{max}} \log\left(\frac{2\sqrt{-d_u d_v f_v g_u} + d_u(g_v - \lambda_{max} + \lambda_{max} d_v)}{d_v f_u}\right) \quad (25)$$

これを λ_{max} で微分すると

$$\frac{\partial \tau}{\partial \lambda_{max}} = -\frac{1}{\lambda_{max}} \left(\tau - \frac{d_u - d_v}{d_v f_u} e^{\lambda_{max} \tau} \right). \quad (26)$$

したがって、

$$\frac{\partial \lambda_{max}}{\partial \tau} = -\frac{d_v f_u \lambda_{max}}{d_v f_u \tau + (d_v - d_u) e^{\lambda_{max} \tau}} \quad (27)$$

$d_v > d_u$ および $\lambda_{max} > 0$ より、この値は常に負になる。つまり、時間遅れ τ を増やすと、 λ_{max} は必ず減少する。

次に、この線形分散関係で $\lambda = 0$ の時の k を算出してみる。4.4 に $\lambda = 0$ を代入すると

$$|-\mathbf{A}_0 - \mathbf{A}_1 + k^2 \mathbf{D}| = |-\mathbf{A} + k^2 \mathbf{D}| = 0. \quad (28)$$

この式は τ を含まない。つまり、線形分散関係の曲線が $\lambda = 0$ を横切る点は、 τ が大きくなっててもかわらないことになる。したがって、 τ を大きくしても λ_{max} は負にはならず、不安定性は消失しないことがわかる。

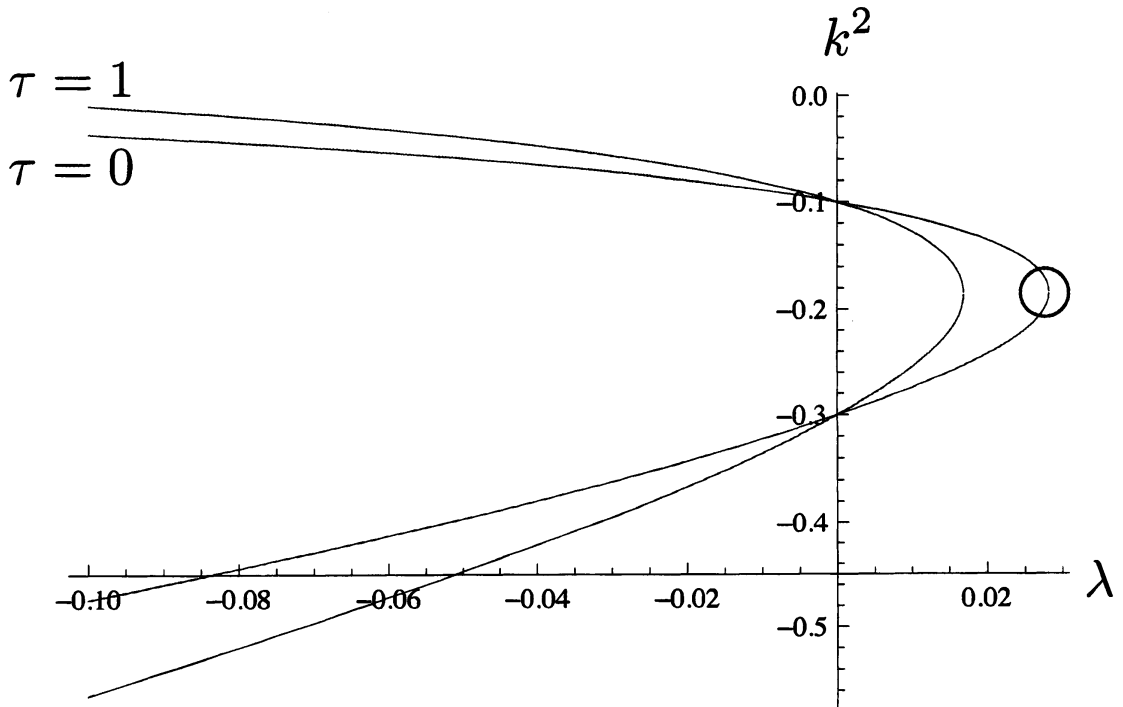


図 3: 時間遅れのある Turing 系の線形分散関係。 τ が変化しても、曲線が $\lambda = 0$ の軸を通過する点は変化しない。

5 実験系での時間遅れの検出

さて、もうひとつ気になる点として、本当に遺伝子発現にこのような時間遅れが存在するのか、という問題がある。これは、実は GFP を使って発現量をライブでモニターすれば簡単に計測することができる。

対数増殖期の COS 細胞に CMV プロモータ下の EGFP をつないだベクターを2時間だけトランスフェクションし、その後、各細胞がどのように蛍光を発するかを経時観察した。EGFP の蛍光強度を u 、細胞に入ったベクターの量を v とする。もしもベクターが入った時刻から産生がスタートするが、 τ だけ時間遅れがあるとすると

$$u' = v \quad (29)$$

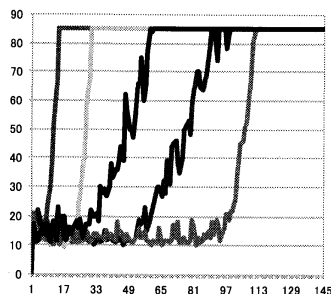
$$v = \begin{cases} 1(t > 2) \\ 0(t \leq 2) \end{cases} \quad (30)$$

となり、時刻 $2 + \tau$ をすぎると蛍光量が徐々にあがってくる、というようなダイナミクスが予測される。

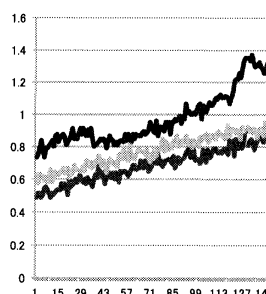
ところが、実際に観測されるデータはかなりおもむきが異なる。まず、蛍光を発する細胞は、実験開始からある時刻がたってから突然かなりの早さで飽和量の蛍光を出すようになる。また、その時刻は細胞によってばらばらで、そのばらつきも2時間よりも遥かに大きい。また、蛍光強度の全体の平均値を見ると、時刻2からすでに上昇を開始しているように見える。

生命現象は複雑なので、理屈で考えて当然のように思える現象も、実測してみるとかなり予測と異なることがある。時間遅れの導入についても、このような実測値に基づいたモデリングが今後必要になると思われる。

個別細胞（最大値）



平均 (24h)



平均 (4h)

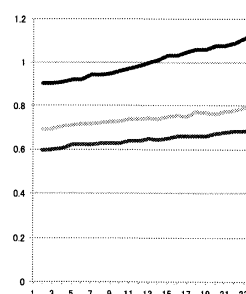


図 4: CMV プロモータ下につないだ EGFP を COS 細胞で発言させたときの輝度変化。個々の細胞で、輝度がある時刻で急に上昇する。全視野の平均を取ると、Transfection 終了直後から少しずつ上昇している。

参考文献

- J. Bard & I. Lauder (1974). 'How well does Turing's theory of morphogenesis work?'. *Journal of Theoretical Biology* 45(2):501-531.
- V. Castets, et al. (1990). 'Experimental evidence of a sustained standing Turing-type nonequilibrium chemical pattern'. *Physical Review Letters* 64(24):2953-2956.
- K. Fujimoto & S. Ishihara (2008). 'Network evolution of body plans'. *PLoS ONE*.

- U. Häcker, et al. (2005). 'Heparan sulphate proteoglycans: the sweet side of development.'. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **6**(7):530–541.
- S. Kondo (1995). 'A reaction-diffusion wave on the skin of the marine angelfish *Pomacanthus*'. *Nature* .
- S. Kondo & T. Miura (2010). 'Reaction-diffusion model as a framework for understanding biological pattern formation.'. *Science (New York, NY)* **329**(5999):1616–1620.
- T. Miura, et al. (2006). 'Mixed-mode pattern in Doublefoot mutant mouse limb–Turing reaction-diffusion model on a growing domain during limb development'. *Journal of Theoretical Biology* **240**(4):562–573.
- J. Murray (2003). 'Mathematical Biology: Spatial models and biomedical applications' .
- I. Salazar-Ciudad, et al. (2001). 'Phenotypic and dynamical transitions in model genetic networks. I. Emergence of patterns and genotype-phenotype relationships.'. *Evolution & development* **3**(2):84–94.
- S. Seirin Lee & E. A. Gaffney (2010). 'Aberrant behaviours of reaction diffusion self-organisation models on growing domains in the presence of gene expression time delays.'. *Bulletin of mathematical biology* **72**(8):2161–2179.
- S. Seirin Lee, et al. (2011). 'The Dynamics of Turing Patterns for Morphogen-Regulated Growing Domains with Cellular Response Delays.'. *Bulletin of mathematical biology* .
- S. Seirin Lee, et al. (2010). 'The influence of gene expression time delays on Gierer-Meinhardt pattern formation systems.'. *Bulletin of mathematical biology* **72**(8):2139–2160.
- H. Shoji & Y. Iwasa (2005). 'Labyrinthine versus straight-striped patterns generated by two-dimensional Turing systems.'. *Journal of Theoretical Biology* **237**(1):104–116.
- A. Turing (1952). 'The chemical basis of morphogenesis'. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* **237**(641):37.
- S. R. Yu, et al. (2009). 'Fgf8 morphogen gradient forms by a source-sink mechanism with freely diffusing molecules'. *Nature* **461**(7263):533–536.